



TITLE:

Bioelectrochemical Characterization of Tungsten-Containing Formate Dehydrogenase and Development of Bioelectrocatalytic Interconversion System between Carbon Dioxide and Formate(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Sakai, Kento

CITATION:

Sakai, Kento. Bioelectrochemical Characterization of Tungsten-Containing Formate Dehydrogenase and Development of Bioelectrocatalytic Interconversion System between Carbon Dioxide and Formate. 京都大学, 2018, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2018-03-26

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21132>

RIGHT:

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	阪井 研人
論文題目	Bioelectrochemical Characterization of Tungsten-Containing Formate Dehydrogenase and Development of Bioelectrocatalytic Interconversion System between Carbon Dioxide and Formate （タングステン含有ギ酸脱水素酵素の生物電気化学的特性評価と二酸化炭素/ギ酸イオン対の生物電気化学的相互変換系の構築）		
（論文内容の要旨）			
<p>持続可能な社会に向けて二酸化炭素（CO₂）の固定化と資源化の技術開発は喫緊の課題である．CO₂を2電子還元したギ酸は、水素と同レベルのエネルギーを有する発電燃料となるのみならず、微生物の炭素源にもなる．したがって、CO₂/ギ酸酸化還元変換系の構築は、化石燃料に代わるエネルギー・物質生産資源の開発に繋がり、水素社会と相補的なC1社会へと展開できる可能性が期待できる．しかし、従来の電解方法では、ギ酸酸化反応とCO₂還元反応の活性化エネルギーは極めて高く、主生成物は一酸化炭素である．一方、生体触媒である酸化還元酵素は、穏和な条件で酸化還元反応を触媒でき、反応物選択性も高いため、物質生産、エネルギー変換触媒、センサー等への応用が期待されている．本研究では、そのような酵素を触媒として、CO₂/ギ酸変換系を生物電気化学的に構築することを目的とした．新規触媒候補としてNAD⁺と共にギ酸イオン（HCOO⁻）をCO₂に酸化する<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1由来のタングステン含有ギ酸脱水素酵素（FoDH1）に注目し、まず生物電気化学的特性を明らかにした．そして、本酵素を利用して、常温・常圧・中性pH条件下でCO₂とHCOO⁻を可逆的に酸化還元変換する系を構築し、その応用展開を行った．</p> <p>第1章では、FoDH1の生物電気化学的特性評価を行った．酸化還元酵素反応を電極反応と共役させることで、酵素機能電極を構築できる．本電極は、酵素を利用した生物電気化学システムの基盤ツールとなる．共役方法として、酵素自体が電極と電子伝達を行う反応（Direct electron transfer-type reaction, DET型反応）と、低分子酸化還元物質（メディエータ）が酵素・電極間の電子伝達を仲介する反応（Mediated electron transfer-type reaction, MET型反応）がある．本章ではまず、DET型反応特性について検討した．その結果、FoDH1は適切に設計した多孔質電極上において、電極との直接電子伝達が可能であり、CO₂/HCOO⁻対だけでなく、NAD⁺/NADH対の相互変換系も触媒できることを見出した．単一酵素で4方向のDET型触媒反応を実現した例は、これまでにない．この触媒電流－電圧曲線の熱力学的解析法を考案し、電極と電子伝達を行うコファクター（鉄－硫黄クラスター）の酸化還元電位を評価した．一方、MET型反応におけるFoDH1とメディエータとの反応特性を検討した結果、FoDH1のメディエータ（第2基質）に対する特異性は低く、酵素－メディエータ間の二次反応速度定数は、自由エネルギーの直線関係に従うことがわかった．この特性を基に、メディエータの酸化還元電位から、CO₂/HCOO⁻対の変換反応の酸化と還元方向の反応速度論的偏りを予測できることを示した．</p>			

第2章では、前章で構築したMET型CO₂/HCOO⁻酸化還元変換系を利用する応用展開を行った。まず、HCOO⁻と酸素の酸化還元反応のエネルギーで発電するHCOO⁻/酸素バイオ燃料電池を構築することを目指した。本研究では、高出力密度のバイオ燃料電池の開発に向けて、MET型反応によるHCOO⁻酸化の酵素触媒電解（バイオ電解）系を設計した。本反応系の電流密度を増加させるには、電極表面積を拡大し、多量の酵素・メディエータを電極表面上に集積することが有用である。また過電圧を減少するため、基質の酸化還元電位に近い電位を有するメディエータを利用することが重要となる。以上を考慮して、ビオローゲンポリマー（viologen polymer, VP）を合成し、多孔質電極上にポリマーと酵素を共固定した。本電極により、低過電圧・高電流密度でのHCOO⁻酸化のバイオ電解ができることを示した。

一方、酸素還元極では、触媒として酸素の4電子還元を触媒する酵素であるビリルビンオキシダーゼ（BOD）を用いた。このとき、溶解度の低い酸素を用いるため、ガス拡散電極を利用した。ガス拡散電極は、ガス状基質を気相から直接供給できるシステムである。ここでは酵素反応のための親水性と、ガス透過のための撥水性の両特性をバランスよく発揮できる多孔質電極を作製した。想定するバイオ燃料電池では、アノード酵素の至適pHが塩基性側に偏っているため、少なくともpH 7.0付近での作動条件が求められる。BODは、pH 5.0において、DET型反応による高い触媒電流密度を実現できるが、中性では期待する性能を発揮できないことがわかった。そこで、2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS) をメディエータとするMET型反応系を構築することで、触媒電流密度を大幅に向上させることに成功した。FoDH1・VP修飾電極をHCOO⁻酸化極、BOD・ABTS修飾電極を酸素還元極としてバイオ燃料電池を構築した結果、開回路電圧は熱力学的理論値（1.25 V）に近い1.21 Vを示し、世界最高出力密度となる12 mW cm⁻²を達成した。

次に、CO₂還元のためのバイオ電解系の高速化を目指した。FoDH1は水溶液中のガス上CO₂だけを酸化型基質として利用するため、溶存系では、溶解度の低いCO₂ガスの物質供給速度が律速となり高速電解の妨げとなった。そこで、ここでもガス拡散系を構築して解決を図った。本システムにより、気相から酵素機能電極界面へ定常的かつ高速にCO₂を供給でき、穏和な条件（常温・常圧・中性pH・静置条件）のもと、CO₂電解電流密度を溶液反応のそれに比べて100倍程度増加させることに成功した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し

審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

二酸化炭素 (CO_2) /ギ酸イオン (HCOO^-) 対の相互変換系は、新エネルギー・物質生産のための資源開発の基盤技術となりうる。しかし、従来の電極を用いた直接電解による変換は、エネルギーロスが極めて大きく、一酸化炭素の発生も問題となっている。本論文では、生体触媒である酸化還元酵素を用い、常温・常圧・中性pH条件下での $\text{CO}_2/\text{HCOO}^-$ 可逆変換系の実現を試みた。具体的には、生物電気化学的変換系の開発に向けて、新規触媒候補となる*Methylobacterium extorquens* AM1由来タングステン含有ギ酸脱水素酵素 (FoDH1) の特性評価を行い、FoDH1による $\text{CO}_2/\text{HCOO}^-$ 相互変換系を構築し、その応用展開を目指した。本論文で評価できる点は以下の通りである。

1. FoDH1 が多孔質電極上において、 $\text{CO}_2/\text{HCOO}^-$ 、 NAD^+/NADH 対の両酸化還元系で、直接電子移動型の酵素電極触媒反応による相互変換を実現できることを見出した。また、触媒電流－電圧曲線の熱力学的解析法を提案し、FoDH1 の電極との反応部位の酸化還元電位を評価した。一方、FoDH1 のメディエータ電子移動 (MET) 型の酵素電極触媒反応特性を解析した結果、FoDH1 のメディエータ (第2基質) 選択性は低く、酵素－メディエータ間の二次反応速度定数は自由エネルギーの直線関係を満たすことを明らかにした。この特性を利用し、メディエータの酸化還元電位から、 $\text{CO}_2/\text{HCOO}^-$ 対の変換反応の酸化と還元方向の反応速度論的偏りを予測できることを示した。
2. FoDH1 とメディエータ能を有するポリマーを組み合わせることで、低過電圧・高電流密度での HCOO^- 酸化のバイオ電解を実現した。そして、FoDH1 とビリルビンオキシダーゼをそれぞれ HCOO^- 酸化触媒と酸素還元触媒として用い、 HCOO^- /酸素バイオ燃料電池を開発した。本システムは実用的な作動環境において、バイオ燃料電池としては世界最高出力密度となる 12 mW cm^{-2} を達成した。
3. 世界で初めての試みであるガス拡散電極上での CO_2 還元の MET 型バイオ電解系を構築することで、高電流密度の CO_2 バイオ還元系を構築した。

以上のように、本論文では、適切な電極形状や実験条件の設定によって、FoDH1 の電気化学的特性解析を行い、その結果に基づいて酵素機能電極を作製することで、 HCOO^- 酸化・ CO_2 還元の双方における応用展開に成功した。その成果は、今後の CO_2 資源化技術の開発において有用と考えられ、生物電気化学、材料科学、酵素科学の発展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成30年1月11日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)